

## 明 細 書

### オクタヒドロナフタレン誘導体及び医薬

### 技術分野

- [0001] 本発明は、オクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩、及び、オクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物に関する。

### 背景技術

- [0002] 細胞接着分子とは、細胞表面に存在し、細胞—細胞および細胞—細胞間基質の接着を仲介する分子群である。接着分子を介した接着という現象は単に細胞の接着にとどまらず、細胞の情報伝達や活性化にも関与しており、炎症・免疫反応をはじめ生体防御反応の中で重要な役割を担っている。炎症に重要な役割を果たす炎症性白血球は、血管内皮に発現した細胞接着分子に接着した後、血管内皮細胞の間をくぐりぬけて組織内部に浸潤し、そこで様々な炎症性メディエーター等を放出することにより、炎症の発症・拡大に重要な役割を果たしている。現在、種々の細胞接着分子の存在が知られているが、中でもICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) は、炎症が生じている血管内皮に著しく発現しており、その関与が強く示唆されている(例えば、非特許文献1参照。)

ICAM-1はT細胞レセプター、CD4、CD8、VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) などと同様免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子で、糖鎖付加の違いにより、76〜114kDaを示すタンパク質である。ICAM-1は当初LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) のリガンドと考えられていたが(例えば、非特許文献2〜3参照。)、その後、Mac-1やCD43のリガンドであることも明らかにされた(例えば、非特許文献4〜5参照。)

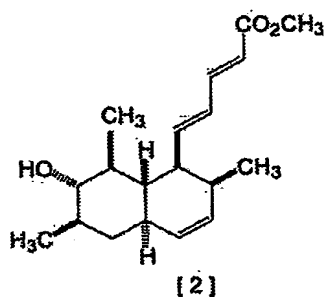
各種動物モデルを用いた検討から、関節リウマチ(例えば、非特許文献6〜7参照。 )のみならず、糸球体腎炎(例えば、非特許文献8参照。)、臓器移植における拒絶反応(例えば、非特許文献9参照。)、肺炎(例えば、非特許文献10参照。)、心筋炎(例えば、非特許文献11参照。)、喘息(例えば、非特許文献12参照。 ) 及び潰瘍(

例えば、非特許文献13参照。)においても抗ICAM-1抗体による治療の有効性が認められたことから、ICAM-1の発現を制御することが種々の疾患の治療につながる可能性が考えられる。

今までに、ICAM-1のアンチセンスや抗体が、リウマチや炎症性疾患の治療剤、免疫抑制剤として開発されてきたが、上市された医薬はまだ存在せず、新たな作用機序を有する新規な炎症性疾患治療剤の創製が期待されている。

[0003] 次の式[2]で表されるCoprophilinは、抗菌作用を有していることが報告されているが、ICAM-1発現抑制作用、抗炎症作用、免疫抑制作用、細胞増殖抑制作用については全く記載されていない(例えば、非特許文献14参照。 )。

[化1]



非特許文献1:Patarroyo M, et al.:Lancet., 1989, Nov 11, 2(8672), 1139-42

非特許文献2:Dustin ML, et al.:Annu. Rev. Immunol., 1991, 9, 27-66

非特許文献3:Springer TA:Nature, 1990, 346, 425-434

非特許文献4:Diamond MS, et al.:J. Cell. Biol., 1990, 111, 3129-3139

非特許文献5:Rosenstein Y, et al.:Nature, 1991, 354, 233-235

非特許文献6:Iigo Y, et al.:J. Immunol., 1991, 147, 4167-4171

非特許文献7:Kavanaugh AF, et al.:Arthritis. Rheum., 1992, 35(Suppl.), 53

非特許文献8:Kawasaki K, et al.:J. Immunol., 1993, 150, 1074-1

083

非特許文献9:Cosimi AB, et al. :J. Immunol. , 1990, 144, 4604-4612

非特許文献10:Barton RW, et al. :J. Immunol. , 1989, 143, 1278-1282

非特許文献11:Seko Y, et al. :J. Clin. Invest. , 1993, 91, 1327-1336

非特許文献12:Wegner CD, et al. :Science, 1990, 247, 456-459

非特許文献13:Wallance JL, et al. :Am. J. Physiol. , 1993, 265, G933-998

非特許文献14:Ondeyka JG, et al. :Bioorg. Med. Chem. Lett. , 1998, 8, 3439-3442

発明の開示

発明が解決しようとする課題

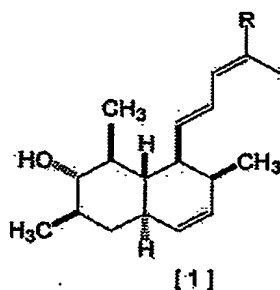
- [0004] 本発明の目的は、ICAM-1発現阻害作用を有する新規なオクタヒドロナフタレン誘導体及びその医薬上許容される塩を提供することにある。さらに、本発明は、細胞増殖抑制作用を有するオクタヒドロナフタレン誘導体及びその医薬上許容される塩を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、本発明にかかるオクタヒドロナフタレン誘導体及びその医薬上許容される塩が上記目的を達成することを見出し、本発明を完成した。

本発明としては、次の一般式[1]で表されるオクタヒドロナフタレン誘導体及びその医薬上許容される塩(以下、本発明化合物という)を挙げることができる。

[化2]



(Rは、カルボキシ、ヒドロキシメチル、アルコキシメチル、アルコキシカルボニル又は  $-\text{CONR}^1\text{R}^2$  を表す。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は、同一又は異なって、水素、フェニル又はアルキルを表し、かかるアルキルは、1)ハロゲン、アルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシで置換されていてもよいフェニル、2)2-ピリジル、3)3-ピリジル、又は、4)4-ピリジルで置換されていてもよい。)

上述のオクタヒドロナフタレン誘導体の中で、N-(ピリジン-3-イルメチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンター-2, 4-ジエン酸アミドが好ましい。

また、本発明としては、本発明化合物を有効成分として含有する医薬組成物、例えば、ICAM-1発現阻害剤、炎症性疾患治療剤、免疫抑制剤、細胞増殖抑制剤を挙げることができる。具体的には、例えば、関節リウマチ治療剤、抗癌剤を挙げることができる。

[0006] 以下に本発明を詳述する。

本発明において「アルキル」としては、直鎖状又は分枝鎖状の炭素数1~10個のもの、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、n-ヘキシル、イソヘキシル、n-ヘプチル、イソヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、n-デシルが挙げられる。特に、直鎖状の炭素数1~3のものが好ましい。

「ジアルキルアミノ」、「アルコキシ」、「アルコキシメチル」及び「アルコキシカルボニル」のアルキル部分としては、上記のアルキルが挙げられる。

「ハロゲン」としては、例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素が挙げられる。

「ICAM-1発現抑制剤」とは、細胞接着分子の一つであるICAM-1の発現を抑制する薬剤をいう。具体的には、例えば、炎症性疾患治療剤、免疫抑制剤を挙げることができる。

「炎症性疾患治療剤」は、炎症を伴う疾患であれば特に限定されない。例えば、関節リウマチ、糸球体腎炎、肺炎、心筋炎、喘息、潰瘍、等の炎症を伴う疾患の治療剤を挙げることができる。

「細胞増殖抑制剤」とは、細胞の増殖を抑制することによって種々の疾患を治療する薬剤をいい、例えば、抗癌剤を挙げることができる。

#### 図面の簡単な説明

[0007] [図1](2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸(以下、化合物Aという)のHMQCスペクトルを表す。縦軸は $^1\text{H}$ 、横軸は $^{13}\text{C}$ である。

[図2]化合物Aの平面構造及びNMR関連シグナルを模式的に示した図である。実線及び点線は、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSYにより決定した平面構造部位を示す。矢印は、HMB Cスペクトルにより相関が認められた個所である。

[図3]化合物AのHMBCスペクトルを表す。縦軸は $^1\text{H}$ 、横軸は $^{13}\text{C}$ である。

[図4]エステル体のNOESYスペクトル表す。縦軸、横軸ともに $^1\text{H}$ である。

[図5]エステル体のオクタヒドロナフタレン環部分の相対立体構造とNOE相関を表す。矢印は、NOEが観測された個所である。

[図6]エステル体のMTPAエステルの $\Delta\delta (= \delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}})$ 値と絶対立体構造を表す。実線は、MTPA平面を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0008] 本発明化合物は、日本国大阪府茨木市のリターより分離したNFS-932株(寄託機関:独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託日:2004年11月15日、受託番号:FERM BP-10162)の産生物及びその誘導体並びにそれらの医薬上許容される塩である。

[0009] NFS-932株の培養

NFS-932株の培養は、それ自身公知の方法により行うことができる。例えば、ジャガイモ・ショ糖寒天培地上に生育させたNFS-932の小片を、滅菌した加工大麦及び蒸留水の入った三角フラスコに植菌し、24℃で一週間静置して前培養とする。次いでこの培養物を、滅菌した加工大麦及び蒸留水の入ったシャーレに種菌として加えてよく混合し、24℃で3週間静置して本培養することにより行うことができる。

[0010] 菌産生物の単離

産生物の単離は、それ自身公知の方法により行うことができる。例えば、加工大麦培養物にメタノールを加え、ホモジナイザーで粉碎・抽出した後、吸引濾過する。濾液に等量の水を加え、吸着カラムクロマトグラフィーに供し、吸着物をメタノール／水で溶出し、活性画分を減圧乾固する。残渣を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルム／メタノールで溶出し、活性画分を減圧乾固する。残渣を再度シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン／酢酸エチルで溶出し、活性画分を減圧乾固する。残渣を高速液体クロマトグラフィーにて精製し、分取画分をそのまま静置することにより結晶を析出させ、これを濾取・乾燥することにより、菌産生物を無色結晶として得ることができる。

[0011] 菌産生物の物理化学的性質

性状：無色結晶

融点：216. 0～218. 6℃

溶解性：メタノール・クロロホルム・アセトンに可溶

水・ヘキサンに不溶

R<sub>f</sub> 値 (TLCアルミニウムシート、シリカゲル60F<sub>254</sub>、メルク製)：

トルエンー酢酸エチルー90%ぎ酸(5:4:1) 0. 66

クロロホルムーアセトンー2-プロパノール(85:15:20) 0. 72

分子式：C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>

元素分析値(C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>として)：

計算値(%) C:74. 96 H:9. 27

実測値(%) C:74. 79 H:9. 27

EI-MS(M<sup>+</sup>): m/z 304

旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +58.71^\circ$  (c 0.998, CH<sub>3</sub>OH)

IR(KBr):  $\nu$  1667cm<sup>-1</sup>

[0012] 菌産生物の平面構造

菌産生物の分子式は、EI-MS(m/z 304, M<sup>+</sup>)及び元素分析(calcd for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>, H:9.27%, C:74.96%; found H:9.27%, C:74.79%)よりC<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>と決定した。さらにこの分子式を<sup>13</sup>C NMRスペクトル及びDEPTスペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>)により確証した。すなわち、菌産生物は4個のメチル基、1個のメチレン基、12個のメチン基(7個のアリファティックメチンと5個のオレフィニックメチン)、1個の4級オレフィン炭素(δ 125.03ppm)及び1個のカルボキシル炭素(δ 169.24ppm、 $\nu$  1667cm<sup>-1</sup>)により構成されることが明らかとなり、分子式と同数の合計19本の<sup>13</sup>CNMRシグナルが観測された(表1を参照)。

次いで、各種NMRスペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>)のデータより、その平面構造を以下の通り決定した。まず<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSYスペクトルにより、全ての<sup>1</sup>Hシグナルを帰属した(表1を参照)。特徴的なシグナルとして、4本のメチルダブレット(うち1本は遠隔カップリングによるもの)、4本のオレフィンダブルダブレットと1本のオレフィンダブルダブレット(<sup>13</sup>C NMRスペクトルにおける1本の4級オレフィン炭素シグナルの存在を考え合わせると、計3個の二重結合)が観測された。またδ 4.38ppmおよびδ 12.13ppmのシグナルは、HMQCスペクトル(図1を参照)において<sup>13</sup>Cとの相関ピークが観測されなかったことから、酸素原子に結合していると予想された。このうちδ 4.38ppmのシグナルはダブレットであることから2級の水酸基であることが示唆され、もう一方のδ 12.13ppmのシグナルはその化学シフトからカルボキシル基であることが示唆された。分子式(C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>)より不飽和度は6となるが、3個の二重結合と1個のカルボニルの存在が示唆されるため、二環性の化合物であると推測された。

菌産生物の<sup>1</sup>H及び<sup>13</sup>C NMR 化学シフト(DMSO-d<sub>6</sub>)を表1に示す。なお、表中の「Position」は、図2の平面構造における炭素番号を示す。

[0013] [表1]

表1 菌産生物の $^1\text{H}$ 及び $^{13}\text{C}$  NMR 化学シフト ( $\text{DMSO}-d_6$ )

Position	$\delta\text{C}$ (ppm)	Type	$\delta\text{H}$ (ppm) [mult, $J$ (Hz)]
1	43.32	CH	1.17 [1H, m]
2	80.23	CH	2.46 [1H, m]
3	39.23	CH	1.37 [1H, m]
4	39.11	$\text{CH}_2$	0.84 [1H, q, 12.3] 1.67 [1H, dt, 13.2/3.3]
5	41.63	CH	1.79 [1H, m]
6	131.38	CH	5.41 [1H, dd, 11.1/1.8]
7	132.26	CH	5.56 [1H, ddd, 9.6/4.5/2.7]
8	36.31	CH	2.11 [1H, m]
9	49.10	CH	2.46 [1H, m]
10	45.11	CH	1.02 [1H, q, 9.9]
11	147.96	CH	6.20 [1H, dd, 15.3/10.5]
12	124.07	CH	6.33 [1H, dd, 15.0/11.1]
13	137.92	CH	7.11 [1H, dd, 11.1/1.5]
14	125.03	C	
15	169.24	CO	
16	18.14	$\text{CH}_3$	0.99 [3H, d, 6.6]
17	19.33	$\text{CH}_3$	0.94 [3H, d, 6.3]
18	16.22	$\text{CH}_3$	0.91 [3H, d, 7.2]
19	12.48	$\text{CH}_3$	1.83 [3H, d, 1.2]
2-OH			4.38 [1H, d, 7.2]
COOH			12.13 [1H, br]

[0014] 次に $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY及びHMQCスペクトルを用いて各原子のつながりを導き出したところ、3つの独立したスピンスステムの存在が明らかとなった(図2の太線を参照)。続いて、溶媒シグナルに対する重なりのため相関がはっきりしなかったH-2及びH-9について、HMBCスペクトル(図3を参照)を用いて相関を求めた(図2の矢印を参照)。まず、ヒドロキシルプロトン( $\delta$  4.38ppm)と相関がある方のプロトン(H-2)については、その結合する炭素(C-2、 $\delta$  80.23ppm)に対して、2-OH、H-4、H-16、H-17からの相関シグナルが観測されたことから、H-2であると結論づけた。もう一方のプロトン(H-9)については、その結合する炭素(C-9、 $\delta$  49.10ppm)に対して、H-10、H-11、H-12、H-18からの相関シグナルが観測されたことから、H-9であると判断した。なお、このように一旦H-2とH-9の両シグナルを区別できれば、これらのシグナルを適切に相関づけることができた(図2の点線を参照)。残るカルボキシル基の位置は、カルボニル炭素(C-15)に対してH-13及びH-19から相関があることから、C-14に結合していると結論した。

二重結合の幾何異性については、相当するオレフィンプロトンの結合定数から類推した。まず環内オレフィンについては、H-6/H-7間の結合定数が $J=11.1\text{Hz}$ で



あることから、これらのプロトンは互いにcis (Z配置)であると決定した。また、側鎖の2つの二重結合のうち縮合環に近い方(C-11/C-12)は、H-11/H-12間の結合定数が $J=15.3\text{ Hz}$ であることから、これらのプロトンは互いにtrans (E配置)であると結論した。残る側鎖中の末端側の二重結合(C-13/C-14)については、一方の炭素が4級炭素であることから、オレフィンプロトンの結合定数では判定できない。そこで、この三置換オレフィンに結合しているメチル基(C-19)の $^{13}\text{C}$  NMRシグナルの化学シフトから判断することにした。すなわちこの値が $\delta 12.48\text{ ppm}$ と高磁場側にシフトしていることから、このメチル基とオレフィンプロトン(H-13)とが互いにtransの関係にある(すなわちE配置)と決定した。この結果は、メチルエステル誘導体のNOESYスペクトル(図4を参照)によっても支持されている。

以上、物理化学的性質及びNMRによる構造解析から、菌産生物の平面構造式を図1に示す通り決定した。従って、菌産生物は、(2E, 4E)-5-(7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル)-2-メチルペンター-2, 4-ジエン酸である。

#### [0015] 菌産生物の相対立体構造

菌産生物の相対立体構造を決定するに際しては、 $^1\text{H}$  NMRスペクトルにおいてシグナルの重なりが多く、さらに溶媒( $\text{DMSO}-d_6$ )シグナル付近の結合定数を解読することが困難であったため、側鎖末端のカルボン酸をメチルエステルに誘導してから実施することにした。該メチルエステル体(以下、エステル体という)は、公知の方法により製造することができ、その物性値は以下の通りである。

元素分析値( $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$ として):

計算値(%) C:75.43 H:9.50

実測値(%) C:75.10 H:9.44

旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +71.64^\circ$  (c 0.469,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

IR(KBr):  $\nu 1709\text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.95[3H, d, 7.0(H-18)], 0.96[1H, q, 11.8(H-4<sub>ax</sub>)], 1.04[3H, d, 6.2(H-16)], 1.08[3H, d, 6.4(H-17)], 1.08[1H, q, 9.7(H-10)], 1.32[1H, m(H-1)], 1.52[1H, m(H-3)]

)], 1.75[1H, dt, 12.8/3.4(H-4<sub>eq</sub>)], 1.85[1H, m(H-5)], 1.93[3H, d, 1.4(H-19)], 2.20[1H, m(H-8)], 2.49[1H, td, 9.4/5.6(H-9)], 2.74[1H, t, 8.8(H-2)], 3.75[3H, s(-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)], 5.44[1H, dt, 9.4/1.8(H-6)], 5.59[1H, ddd, 9.6/4.0/2.6(H-7)], 6.14[1H, dd, 14.8/9.6(H-11)], 6.27[1H, dd, 15.0/10.6(H-12)], 7.20[1H, dq, 10.6/1.4(H-13)]

- [0016] エステル体のオクタヒドロナフタレン環部位の相対立体配置は、<sup>1</sup>H NMRシグナルのビンナル結合定数(上記物性値を参照)とNOESYスペクトルのデータを合わせて決定した(図5を参照。)。H-2メチンプロトン(δ 2.74ppm)は結合定数J=8.8Hzを持つトリプレットであることからアキシアルに配向しており、必然的に隣接するH-1及びH-3についてもそれぞれアキシアル配向であることが結論できる。すなわち、シクロヘキサン環はイス型コンホメーションをとっており、C-1、C-3位のメチル基及びC-2位のヒドロキシル基はエクアトリアル配位である。一方、H-2からはH-4アキシアルプロトン(H-4<sub>ax</sub>、δ 0.96, q, J=11.8Hz)及びH-10(δ 1.08, q, J=9.7Hz)に対してNOEが観測され、さらにH-4<sub>ax</sub>とH-10の間でもNOEが観測されたことから、これらのプロトンは互いに1,3-ジアキシアルの関係にあると結論できる。H-4<sub>ax</sub>及びH-10はいずれも大きな結合定数を持つカルテットであることから、これらに隣接するH-5及びH-9も同様にアキシアルに配向している。このことは、H-9とH-1、H-5の間にNOEが観測されたことから支持される。同様のNOE効果がH-8とH-9の間でも観測され、逆にH-8とH-10の間にNOEが観測されなかったことから、H-8はエクアトリアルに配向していると結論づけることができる。H-8は、H-5(弱い)及びH-7(強い)に対してもNOEを示したが、前者のNOEは、シクロヘキセン環の擬イス型/ボート型コンホメーションの反転によって説明することができる。一方のH-9は、側鎖のオレフィンプロトンH-11及びH-12に対してもNOEを示した。

以上、NMRによる構造解析から、エステル体のオクタヒドロナフタレン環部位の相対立体構造を図5に示す通り決定した。

- [0017] 菌産生物の絶対立体構造

菌産生物の絶対立体構造は、エステル体到新Mosher法(Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 4092-4096)を適用して決定した。エステル体をS-及びR-MTPAクロリド( $\alpha$ -メキシ- $\alpha$ -(トリフルオロメチル)フェニルアセチルクロリド)と反応させることにより、それぞれR-及びS-MTPAエステルに誘導し、各 $^1\text{H}$  NMRシグナルの化学シフトの差より絶対立体構造を決定した。

[0018] エステル体のR-MTPAエステル体の $^1\text{H}$  NMRシグナルの化学シフトは以下の通りである。

$^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.80[3H, d, 6.2(H-16)], 0.89[3H, d, 6.2(H-17)], 0.95[3H, d, 7.4(H-18)], 1.07[1H, q, 12.0(H-4<sub>ax</sub>)], 1.16[1H, q, 10.0(H-10)], 1.59[1H, m(H-1)], 1.70[1H, m(H-3)], 1.81[1H, m(H-4<sub>eq</sub>)], 1.87[1H, m(H-5)], 1.91[3H, d, 1.2(H-19)], 2.20[1H, m(H-8)], 2.47[1H, td, 9.4/5.6(H-9)], 3.55[3H, s(MTPA-OCH<sub>3</sub>)], 3.75[3H, s(-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)], 4.60[1H, t, 10.0(H-2)], 5.44[1H, dt, 9.6/1.4(H-6)], 5.61[1H, ddd, 9.2/4.0/2.6(H-7)], 6.09[1H, dd, 15.0/9.4(H-11)], 6.23[1H, dd, 15.0/10.2(H-12)], 7.16[1H, dd, 10.6/1.4(H-13)], 7.40[3H, m(MTPA-Ph)], 7.61[2H, m(MTPA-Ph)]

[0019] エステル体のS-MTPAエステル体の $^1\text{H}$  NMRシグナルの化学シフトは以下の通りである。

$^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.80[3H, d, 6.4(H-17)], 0.89[3H, d, 6.2(H-16)], 0.96[3H, d, 7.0(H-18)], 1.05[1H, q, 12.0(H-4<sub>ax</sub>)], 1.17[1H, q, 9.8(H-10)], 1.61[1H, m(H-1)], 1.68[1H, m(H-3)], 1.79[1H, m(H-4<sub>eq</sub>)], 1.83[1H, m(H-5)], 1.93[3H, d, 1.0(H-19)], 2.22[1H, m(H-8)], 2.49[1H, td, 9.4/5.6(H-9)], 3.53[3H, s(MTPA-OCH<sub>3</sub>)], 3.76[3H, s(-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)], 4.61[1H, t, 10.0(H-2)], 5.44[1H, dt, 9.6/1.4(H-6)], 5.61[1H, ddd, 9.4/4.4/2.6(H-7)], 6.11[1H, dd, 15.0/9.8(H-11)], 6.25[1H, dd,

15.0/10.2(H-12)], 7.18[1H, dd, 10.4/1.4(H-13)], 7.40[3H, m(MTPA-Ph)], 7.61[2H, m(MTPA-Ph)]

[0020] 両MTPAエステル<sup>1</sup>H NMRシグナルの化学シフトの差( $\Delta\delta = \delta_s - \delta_R$ )を求め、菌産生物の構造式中にその値をプロットした(図6)。その結果、 $\Delta\delta$ の値は分子の一方(図6中の上方)に正の値が並び、MTPA平面を挟んで反対側(図6中の下方)に負の値が並んだ。これら正/負の符号から、新Mosher法の規則に従って、MTPAエステル化された2級ヒドロキシル基が結合している炭素(C-2)の絶対立体化学をSであると決定した。残りの不斉炭素については、既に明らかにした相対配置に従って、C-2より順次決定した。

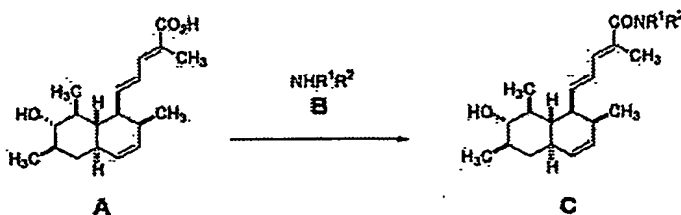
以上の結果、エステル体の絶対立体構造を、図6に示した通り、1S, 2S, 3R, 5R, 8S, 9S, 10Sであると決定した。従って、菌産生物は、(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸(化合物A)である。

#### [0021] 菌産生物の誘導体

本発明化合物は、上述の菌産生物、及び、公知化合物又は容易に調製可能な中間体から、例えば下記の方法に従って製造することができる。本発明化合物の製造において、原料が反応に影響を及ぼす置換基を有する場合には、原料をあらかじめ公知の方法により適当な保護基で保護した後に反応を行うのが一般的である。保護基は、反応後に、公知の方法により脱離することができる。

[0022] 菌産生物の誘導体であるアミド体は、それ自身公知の方法により容易に製造することができるが、例えば、以下の方法で製造可能である。

[化3]



本反応は、菌産生物である化合物Aと化合物Bとの縮合反応であって、それ故、縮合反応としてそれ自体知られた公知の方法によって行われる。化合物Aで表されるカルボン酸又はその反応性誘導体と、化合物Bで表されるアミンを反応させることにより、化合物Cを製造することができる。化合物Aの反応性誘導体としては、例えば、酸ハライド(例えば、酸クロリド、酸ブロミド)、混合酸無水物、イミダゾリド、活性アミド等、アミド縮合形成反応に通常用いられるものを挙げることができる。化合物Aを用いる場合は、縮合剤(例えば、1, 1'-オキサリルジイミダゾール、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、シアノホスホン酸ジエチル、ジフェニルホスホリルアジド、よう化 2-クロロ-1-メチルピリジニウム、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウム、ヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム、ヘキサフルオロホスフェート)が使用され、塩基(例えば、トリエチルアミン、N, N-ジイソプロピル-N-エチルアミン、N, N-ジメチルアニリン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン、1, 8-ジアザビシクロ[5. 4. 0]ウンデセ-7-エンの有機塩基)の存在又は非存在下に、-20~100℃で反応を行う。使用される溶媒は、反応に関与しなければ特に限定されないが、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテルなどのエーテル類、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミドなどのアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、ベンゼン、トルエンなどの炭化水素類、クロロホルム、ジクロロメタンなどのハロゲン化炭化水素類、又はこれらの混合溶媒を挙げるができる。この際、添加剤(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシコハク酸イミド等)を加えることもできる。反応時間は、原料及び縮合剤の種類、反応温度等によって異なるが、通常、30分~24時間が適当である。化合物B及び縮合剤の使用量は、化合物Aに対して1~3倍モル量が好ましい。化合物Aの反応性誘導体として、例えば酸ハライドを用いる場合は、ピリジン、4-メチルピリジンなどのピリジン系溶媒又は前記と同じ塩基と溶媒を使用し、-20~100℃で反応を行う。また、添加物として、例えば4-ジメチルアミノピリジンを加えることもできる。反応時間は、使用する酸ハライドの種類、反応温度によって異なるが、通常、30分~24時間が適当である。

[0023] 菌産生物の誘導体であるエステル体(例えば、実施例2を参照。)、ヒドロキシメチル体(例えば、実施例3を参照。)、アルコキシメチル体(例えば、実施例4を参照。)は、公知の方法により容易に製造することができる。

[0024] 本発明にかかるオクタヒドロナフタレン誘導体はそのまま医薬として用いることができるが、医薬上許容される塩を形成する場合は、塩の形にして用いることもできる。このような塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、燐酸などの鉱酸の塩、酢酸、クエン酸、酒石酸、マレイン酸、コハク酸、フマル酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、メタンスルホン酸などの有機酸の塩、又は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム等の無機塩基、メチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリエタノールアミン、エチレンジアミン、トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン、グアニジン、コリン、シンコニン等の有機塩基、リジン、アルギニン、アラニン等のアミノ酸との塩などを挙げることができる。

例えば、本発明にかかるオクタヒドロナフタレン誘導体の塩酸塩は、本発明にかかるオクタヒドロナフタレン誘導体を塩化水素のアルコール溶液、酢酸エチル溶液又はエーテル溶液に溶解することにより得ることができる。

なお、本発明においては各化合物の含水物、水和物及び溶媒和物も包含される。

[0025] 本発明化合物を医薬として投与する場合、本発明化合物は、そのまま又は医薬上許容され得る無毒性かつ不活性の担体中に、例えば0.1～99.5%、好ましくは0.5～90%を含有する医薬組成物として、人を含む哺乳動物に投与することができる。

担体としては、固形、半固形又は液状の希釈剤、充填剤及びその他の処方用の助剤一種以上が用いられる。医薬組成物は、投与単位形態で投与することが望ましい。本発明にかかる医薬組成物は、静脈内投与、経口投与、組織内投与、局所投与(経皮投与など)又は経直腸的に投与することができる。これらの投与方法に適した剤型で投与されるのはもちろんである。

ICAM-1発現抑制剤、炎症性疾患治療剤、細胞増殖抑制剤としての用量は、病気の性質と程度、年齢、体重などの患者の状態、投与経路などを考慮した上で設定することが望ましいが、通常は、成人に対して本発明化合物の有効成分量として、1

日あたり、0.1～1000mg／ヒトの範囲、好ましくは1～500mg／ヒトの範囲が一般的である。

場合によっては、これ以下で足りるし、また逆にこれ以上の用量を必要とすることもできる。また1日2～3回に分割して投与することもできる。

## 実施例

[0026] 以下に参考例、実施例、試験例及び製剤例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

### 参考例1

#### エステル体のR-MTPAエステルの合成

実施例2で得られた化合物32mgをピリジン1mlに溶解し、室温攪拌下、(S)－(+)－ $\alpha$ －メトキシ－ $\alpha$ －(トリフルオロメチル)フェニルアセチルクロリド((S)－(+)－MTPAクロリド)51mgを滴下した。室温で14時間攪拌後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ワコ－ゲルC－200、和光純薬製、3g)で精製し、目的化合物39mgを無色油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 0.80[3H, d], 0.89[3H, d], 0.95[3H, d], 1.07[1H, q], 1.16[1H, q], 1.59[1H, m], 1.70[1H, m], 1.81[1H, m], 1.87[1H, m], 1.91[3H, d], 2.20[1H, m], 2.47[1H, td], 3.55[3H, s], 3.75[3H, s], 4.60[1H, t], 5.44[1H, dt], 5.61[1H, ddd], 6.09[1H, dd], 6.23[1H, dd], 7.16[1H, dd], 7.40[3H, m], 7.61[2H, m]

### 参考例2

#### エステル体のS-MTPAエステルの合成

実施例2で得られた化合物32mgをピリジン1mlに溶解し、室温攪拌下、(R)－(－)－ $\alpha$ －メトキシ－ $\alpha$ －(トリフルオロメチル)フェニルアセチルクロリド((R)－(－)－MTPAクロリド)51mgを滴下した。室温で14時間攪拌後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。水洗後、無水硫酸マグネシウムで

乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ワコゲルC-200、和光純薬製、3g)で精製し、目的化合物32mgを無色油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.80[3H, d], 0.89[3H, d], 0.96[3H, d], 1.05[1H, q], 1.17[1H, q], 1.61[1H, m], 1.68[1H, m], 1.79[1H, m], 1.83[1H, m], 1.93[3H, d], 2.22[1H, m], 2.49[1H, td], 3.53[3H, s], 3.76[3H, s], 4.61[1H, t], 5.44[1H, dt], 5.61[1H, ddd], 6.11[1H, dd], 6.25[1H, d], 7.18[1H, dd], 7.40[3H, m], 7.61[2H, m]

#### [0027] 実施例1

##### 化合物A

##### (1) 菌の採取

日本国大阪府茨木市のリターより分離したNFS-932株(寄託機関:独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託日:2004年11月15日、受託番号:FERM BP-10162)を使用した。各種培地上での孢子形成、菌糸形態、生育速度、色調などから既報告菌との比較を行い、本生産菌をTrichoderma属に属する不完全菌の一種であると同定した。

##### (2) NFS-932株の培養

ジャガイモ・ショ糖寒天培地上に生育させたNFS-932株の小片を、滅菌した加工大麦「はつらつ(はくばく製)」10g及び蒸留水5mlの入った三角フラスコに植菌し、24℃で一週間静置して前培養とした。次いでこの培養物を、滅菌した加工大麦250g及び蒸留水125mlの入ったシャーレに種菌として加えてよく混合し、24℃で3週間静置して本培養とした。

##### (3) 化合物Aの単離精製

加工大麦培養物1kgにメタノール3Lを加え、ホモジナイザーで粉碎・抽出した後、吸引濾過した。濾液に等量の水を加え、吸着カラムクロマトグラフィー(ダイアイオンHP-20、三菱化成製、250ml)に供した。吸着物を、40、60、80、100%メタノール/水各1Lで溶出し、このうち80%及び100%メタノール/水溶出画分を合わせて減圧乾固した(3.46g)。残渣を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲルカラムクロマ



トグラフィー(ワコーゲルC-200、和光純薬製、170g)に供した。クロロホルム中のメタノール濃度を段階的に上げて展開し、1~2%メタノール/クロロホルム溶出面分を集めて減圧乾固した(0.54g)。残渣を再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ワコーゲルC-200、和光純薬製、25g)に供し、ヘキサン中の酢酸エチル濃度を段階的に上げて展開した。活性画分の一部を減圧乾固し(0.07g)、残渣を高速液体クロマトグラフィー(カプセルパックC<sub>18</sub> UG80、250×20mmI. D.、資生堂製)にて精製した。分取画分をそのまま静置することにより結晶を析出させ、これを濾取・乾燥することにより、目的化合物を無色結晶として得た(0.03g)。

性状: 無色結晶

融点: 216.0~218.6°C

溶解性: メタノール・クロロホルム・アセトンに可溶

水・ヘキサンに不溶

R<sub>f</sub> 値(TLCアルミニウムシート、シリカゲル60 F<sub>254</sub>、メルク製):

トルエン-酢酸エチル-90%ギ酸(5:4:1) 0.66

クロロホルム-アセトン-2-プロパノール(85:15:20) 0.72

分子式: C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>

元素分析値(C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>として):

計算値(%) C:74.96 H:9.27

実測値(%) C:74.79 H:9.27

EI-MS(M<sup>+</sup>): m/z 304

旋光度: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +58.71° (c 0.998, CH<sub>3</sub>OH)

IR(KBr): ν 1667cm<sup>-1</sup>

## 実施例2

(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸メチル

化合物A100mgをテトラヒドロフラン-メタノール(4:1)2mlに溶解し、室温攪拌下

、トリメチルシリルジアゾメタン(2.0M ヘキサン溶液)197 $\mu$ lを滴下して、室温で1.5時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(フューゲルC-200、和光純薬製、6g)で精製し、目的化合物105mgを無色結晶として得た。

融点: 54~57°C

元素分析値(C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>として):

計算値(%) C:75.43 H:9.50

実測値(%) C:75.10 H:9.44

旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +71.64^\circ$  (c 0.469, CH<sub>3</sub>OH)

IR(KBr):  $\nu$  1709cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.95[3H, d], 0.96[1H, q], 1.04[3H, d], 1.08[3H, d], 1.08[1H, q], 1.32[1H, m], 1.52[1H, m], 1.75[1H, dt], 1.85[1H, m], 1.93[3H, d], 2.20[1H, m], 2.49[1H, td], 2.74[1H, t], 3.75[3H, s], 5.44[1H, dt], 5.59[1H, ddd], 6.14[1H, dd], 6.27[1H, dd], 7.20[1H, dq]

### 実施例3

(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン-1-オール

水素化リチウムアルミニウム37mgをテトラヒドロフラン2mlに懸濁し、系内をアルゴン置換した。室温攪拌下、化合物A200mgのテトラヒドロフラン溶液2mlを10分間かけて滴下し、24時間加熱還流した。反応液を氷冷後、水0.37ml、15%水酸化ナトリウム水溶液0.37ml、水 1.11mlを順次滴下し、氷浴をはずして、灰色の不溶物が白色になるまで室温で30分間攪拌した。不溶物を濾去し、濾液を減圧濃縮した残渣に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(PSQ 100B、富士シリシア製、20g)で精製し、目的化合物124mg

gを無色アモルファスとして得た。

元素分析値( $C_{19}H_{30}O_2 \cdot 0.7H_2O$ として):

計算値(%) C:75.30 H:10.44

実測値(%) C:75.26 H: 9.94

旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +15.11^\circ$  (c 0.900、 $CH_3OH$ )

$^1H-NMR(DMSO-d_6)$   $\delta$ : 0.82[1H, q], 0.89[3H, d], 0.93[3H, d], 0.96[1H, m], 1.00[3H, d], 1.14[1H, m], 1.34[1H, m], 1.65[1H, dt], 1.65[3H, s], 1.78[1H, m], 2.08[1H, m], 2.33[1H, dd], 2.43[1H, dd], 3.83[2H, d], 4.36[1H, d], 4.76[1H, t], 5.39[1H, d], 5.55[1H, ddd], 5.67[1H, dd], 5.99[1H, dd], 6.18[1H, dd]

#### 実施例4

(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエニル-メチルエーテル

実施例3で得られた化合物85mgをテトラヒドロフラン2mlに溶解し、ヨウ化メチル22  $\mu$ l及び60%水素化ナトリウム29mgを順次添加して、室温で24時間攪拌した。反応液に水を加えて酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(PSQ 100B、富士シリシア製、10g)で精製し、目的化合物62mgを無色油状物として得た。

元素分析値( $C_{20}H_{32}O_2 \cdot 0.1H_2O$ として):

計算値(%) C:78.43 H:10.60

実測値(%) C:78.21 H:10.61

旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +10.94^\circ$  (c 0.457、 $CH_3OH$ )

$^1H-NMR(CDCl_3)$   $\delta$ : 0.94[1H, q], 0.94[3H, d], 1.04[3H, d], 1.10[3H, d], 1.27[1H, m], 1.36[1H, m], 1.50[1H, m], 1.75[1H, dt], 1.75[3H, d], 1.86[1H, m], 2.17[1H, m], 2.41[1H, ddd], 2.73[1H, t], 3.31[3H, s], 3.85[2H, s], 5.42[1H, dt], 5.59[1H, ddd], 5.74[1H, d]

d], 6.02[1H, dq], 6.17[1H, dd]

#### 実施例5

N-(ピリジン-3-イルメチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

化合物A3.04gをN, N-ジメチルホルムアミド45mlに溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩2.11g及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1.84gを添加して、室温で30分間攪拌した。室温攪拌下、次いで3-(アミノメチル)ピリジン1.19gのN, N-ジメチルホルムアミド溶液5ml及びトリエチルアミン3mlを順次滴下した。室温で18時間攪拌後、反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。得られた粗結晶を酢酸エチルで洗浄し、目的化合物2.85gを無色結晶として得た。

融点: 163~164°C

元素分析値(C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>として):

計算値(%) C:76.10 H:8.69 N:7.10

実測値(%) C:75.84 H:8.67 N:7.02

旋光度:  $[\alpha]_D^{20} +76.69^\circ$  (c 1.103, CH<sub>3</sub>OH)

IR(KBr):  $\nu$  1653cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.84[1H, q], 0.91[3H, d], 0.94[3H, d], 1.01[3H, d], 1.02[1H, q], 1.18[1H, m], 1.37[1H, m], 1.67[1H, dt], 1.80[1H, t], 1.89[3H, s], 2.12[1H, m], 2.44[1H, m], 2.46[1H, m], 4.35[2H, d], 4.38[1H, d], 5.42[1H, dd], 5.56[1H, ddd], 6.05[1H, dd], 6.31[1H, dd], 6.87[1H, d], 7.33[1H, dd], 7.66[1H, dt], 8.41[1H, d], 8.44[1H, dd], 8.49[1H, d]

実施例5と同様にして、以下の化合物を合成した。

## 実施例6

N-(ピリジン-4-イルメチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例7

N-(ピリジン-2-イルメチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例8

N-ベンジル-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例9

N-(3-メトキシベンジル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例10

N-(4-クロロベンジル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例11

N-(4-メチルベンジル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例12

N-[4-(N', N'-ジメチルアミノ)ベンジル]-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例13

N-(ピリジン-4-イルエチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例14

N-(4-ヒドロキシフェネチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例15

N-(フェニルブチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例16

N-フェニル-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

## 実施例17

N-メチル-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミド

ル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

実施例18

N-(n-ブチル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

実施例19

N-(t-ブチル)-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

実施例20

N,N-ジメチル-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

実施例21

N-ベンジル-N-メチル-(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

実施例22

(2E,4E)-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-7-ヒドロキシ-2,6,8-トリメチル-1,2,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2,4-ジエン酸アミド

[0028] 試験例1

ICAM-1発現抑制試験(Enzyme Immuno Assay, EIA)

培養培地に血管内皮細胞用血清含有液体培地(日水製薬製)を用い、HUVEC(臍帯静脈血管内皮細胞、森永生科学研究所製)を常法によりコラーゲン処理フラスコ内で培養した。

HUVECからのICAM-1の発現に対する抑制テストを行う際には、コラーゲン処理96穴プレートを用いて、HUVECを $1\sim 2\times 10^4$  cells/well、 $100\sim 200\mu\text{l}$  medium/well添加し、 $37^\circ\text{C}$   $5\%\text{CO}_2$  下で48~72時間培養した。試験溶液を添加する前に培地( $80\mu\text{l}$ )を交換し、予め希釈しておいた試験溶液を $10\mu\text{l}$ 添加して、 $\text{CO}_2$  インキュベータ内に静置した。2時間後に、TNF- $\alpha$  (組換えヒトTNF- $\alpha$ 、Genzyme製)を $10\mu\text{l}$ 添加し(最終濃度 $0.3\text{ng/ml}$ )、再び $\text{CO}_2$  インキュベータ内で静置した。16~22時間後、1%パラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定した。 $\text{Ca}^{2+}$  及び $\text{Mg}^{2+}$  含有リン酸緩衝液で細胞を洗浄し、続いて抗ヒトICAM-1抗体(マウスIgG1、協和メディックス製)を室温で30分間作用させた。再度リン酸緩衝液で細胞を洗浄した後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(H+L)(Organon Teknica Corp. 製)でさらに30分間処理した。再度リン酸緩衝液で細胞を洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色キット(住友ベークライト製)を用いて発色量を測定し、HUVEC上に発現したICAM-1を薬物非添加群に対する発現阻害率(%)として求め、 $\text{IC}_{50}$  値を算出した。その結果を表2に示す。

[表2]



表2 ICAM-1発現抑制試験

試験薬物	IC <sub>50</sub> (×10 <sup>μ</sup> M)
実施例1	5.9
実施例2	0.067
実施例3	0.99
実施例4	0.22
実施例5	0.017
実施例6	0.059
実施例7	0.20
実施例8	0.047
実施例9	0.21
実施例10	1.4
実施例11	1.6
実施例12	3.2
実施例13	0.57
実施例14	1.5
実施例15	1.5
実施例16	0.26
実施例17	0.24
実施例18	1.5
実施例19	0.14
実施例20	0.49
実施例21	0.88
実施例22	

表2に示す通り、本発明化合物がICAM-1発現抑制作用を有していることは明らかである。

[0029] 試験例2

メチル化ヒト血清アルブミン誘導遅延型過敏反応試験 (MeHSA-DTH)

生理食塩液にメチル化ヒト血清アルブミン (MeHSA) を5mg/mlで溶解し、等量の完全フロイントアジュバント (ヤトロン社製) と混合し、乳化剤を作製した。作製した乳化剤100 $\mu$ lを8週齢の雄性C57BL/6マウスの皮下に注射することで抗原感作を行った。7日後、生理食塩液にMeHSAを1mg/mlで溶解し、マウスの右後肢足蹠皮下に25 $\mu$ l注射することで反応を惹起した。反応惹起24時間後の足蹠の厚さを測定し、反応惹起前の厚さとの差を算出し、評価した。なお、薬物は反応惹起の1時間前および16時間後の2回経口投与した。その結果を表3に示す。

[表3]

表3 メチル化ヒト血清アルブミン誘導遅延型過敏反応試験

被験薬物	用量 (mg/kg)	抑制率 (%)
実施例5	10	27.5 *
	30	61.5 **
実施例6	10	27.8 *
	30	35.7 **

\* : P&lt;0.01, \*\* : P&lt;0.05 (ダネット検定)

表3に示す通り、本発明化合物がリンパ球浸潤による炎症性疾患の治療に有用であることは明らかである。

## [0030] 試験例3

マウスコラーゲン関節炎モデルを用いた試験

ウシ関節由来II型コラーゲンを2mg/mlの濃度になるように0.1M酢酸生理食塩溶液に溶解し、完全フロイントアジュバント(ヤトロン社製)と等量混合し、乳化剤を作製した。8週齢の雄性 DBA/1Jマウスの尾根部皮内に注射して一次感作を行い21日後、同様に調製した乳化剤0.1mlをマウス背部皮内に注射して二次感作を行い、関節炎を発症させた。二次感作から2週間後、関節炎症状を肉眼的に観察した(0:正常、1:指先の腫脹・発赤、2:手足関節から遠位部の軽度の腫脹・発赤、3:手足関節から遠位部の高度の腫脹・発赤)。関節炎症状は四肢それぞれについて観察し、その合計を個体の関節炎スコアとした。なお、被験薬物は0.5%メチルセルロースに懸濁し、二次感作以降、連日経口投与した。その結果を表4に示す。

[表4]

表4 マウスコラーゲン関節炎モデルを用いた試験

被験薬物	用量 (mg/kg)	例数	関節炎スコア
薬物非投与群	—	10	5.7
実施例5	30	9	2.1 *

\* : P&lt;0.05 (ウィルコクソン順位和検定)

表4に示す通り、本発明化合物が関節リウマチの治療に有用であることは明らかである。

次に、本発明化合物が細胞増殖抑制作用を有しているか否かについて検討を行った。

[0031] 試験例4

細胞増殖抑制試験

各種癌細胞及び正常細胞は、培養液中で培養した70～90%コンフルエント状態のものを使用した。培養液を除去後、0.25%トリプシン/1mM-EDTA溶液を加えて細胞を剥離し、細胞数を計測した後、 $5 \times 10^4$  cells/mlの細胞懸濁液を調製した。これを96穴プレートに90  $\mu$ l/wellずつ分注し、CO<sub>2</sub>インキュベータ内に静置した。翌日、(0～10  $\mu$ Mの被験薬物(実施例5の化合物)を10  $\mu$ l/wellずつ添加し、穏やかに振盪して培養液と十分に混合させた。3日間培養後、5mg/ml MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)水溶液10  $\mu$ lずつを添加した。CO<sub>2</sub>インキュベータ内でさらに4時間培養後、0.04N塩酸を含む2-プロパノール溶液100  $\mu$ lを各ウェルに添加して反応を停止した。生成したMTTホルマザンをマルチチャンネルピペットで十分に溶解し、655nmを対照波長として、595nmの吸光度を測定した。測定した吸光度について、MTT法のモデル式を用いて非線形回帰分析を行い、細胞増殖を50%阻害する濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した。本試験に用いた細胞、及びその培養液は下記の通りである。

1) 細胞 : A549 (ヒト肺癌細胞、財団法人ヒューマンサイエンス)

培養液: DMEM (ダルベッコ変法イーグル培地) + 10% FBS (ウシ胎児血清)

2) 細胞 : PC-3 (ヒト前立腺癌細胞、ATCC)

培養液: DMEM + 10% FBS

3) 細胞 : AsPC-1 (ヒト膵癌細胞、東京大学)

培養液: DMEM + 10% FBS

4) 細胞 : HT-1080 (ヒト繊維肉腫細胞、ATCC)

培養液: DMEM + 10% FBS

5) 細胞 : Hepatocyte (正常ヒト肝細胞、ACRBI)

培養液: CS-C (セルシステムズ社)

6) 細胞 : NHDF (正常ヒト繊維芽細胞、クラボウ)

培養液:DMEM+10%FBS

7)細胞 :BAE(正常ウシ大動脈血管内皮細胞、ACRBI)

培養液:CS-C(セルシステムズ社)

試験結果を表5に示す。

[表5]

表5 細胞増殖抑制試験

細胞	IC <sub>50</sub> (nM)
A549 (ヒト肺癌細胞)	85
PC-3 (ヒト前立腺癌細胞)	67
AsPC-1 (ヒト肺癌細胞)	113
HT-1080 (ヒト繊維肉腫細胞)	70
Hepatocyte (正常ヒト肝細胞)	430
NHDF (正常ヒト繊維芽細胞)	600
BAE (正常ウシ大動脈血管内皮細胞)	9400

表5に示す通り、実施例5の化合物は正常細胞よりヒト由来癌細胞に対してより強い増殖抑制作用を示した。この結果より、本発明化合物が細胞増殖抑制剤として有用であることは明らかである。

#### [0032] 製剤例1

錠剤(内服錠)

処方1錠80mg中

実施例1の化合物	5.0mg
トウモロコシ澱粉	46.6mg
結晶セルロース	24.0mg
メチルセルロース	4.0mg
ステアリン酸マグネシウム	0.4mg

この割合の混合末を通常の方法により打錠成形し内服錠とする。

#### 製剤例2

錠剤(内服錠)

処方1錠80mg中

実施例2の化合物	5.0mg
トウモロコシ澱粉	46.6mg

結晶セルロース	24. 0mg
メチルセルロース	4. 0mg
ステアリン酸マグネシウム	0. 4mg

この割合の混合末を通常の方法により打錠成形し内服錠とする。

#### 産業上の利用可能性

- [0033] 本発明化合物は、ICAM-1の発現を抑制することから、ICAM-1発現阻害剤、炎症性疾患治療剤、免疫抑制剤として有用である。また、本発明化合物は、細胞増殖を抑制することから、細胞増殖抑制剤として有用である。

PCT

紙面による写し (注意: 電子データが原本となります)  
 [この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0-1	様式-PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、右記によって作成された。	JPO-PAS 0321
0-1-1		
0-2	国際出願番号	PCT/JP2004/019402
0-3	出願人又は代理人の書類記号	S564W0041224

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0008
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第6
1-3-3	寄託の日付	2004年 11月 15日 (15.11.2004)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-10162
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

## 受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	萬崎 茂夫

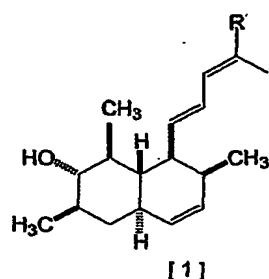
## 国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

## 請求の範囲

- [1] 次の一般式[1]で表されるオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩。

[化4]

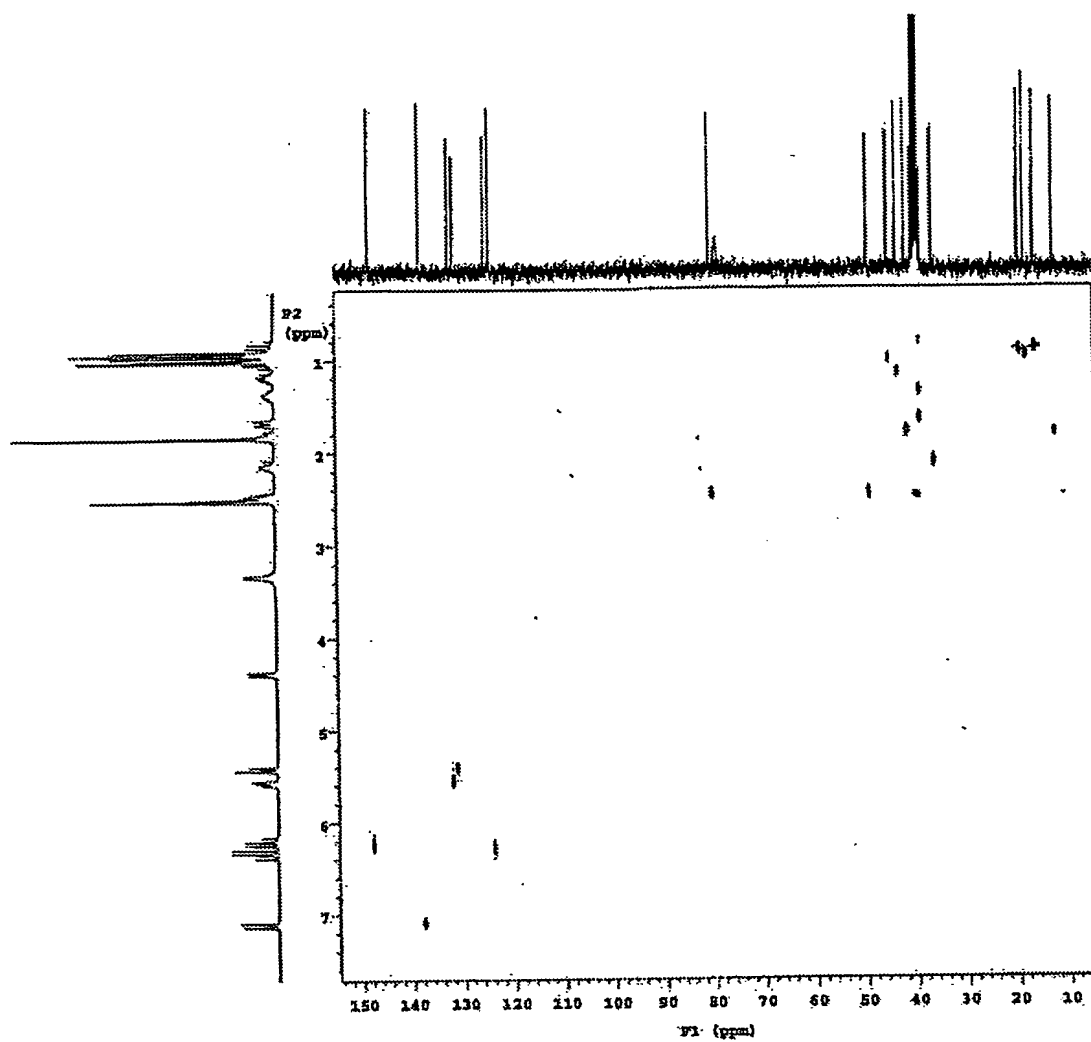


- (Rは、カルボキシ、ヒドロキシメチル、アルコキシメチル、アルコシカルボニル又は  $-\text{CONR}^1\text{R}^2$  を表す。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は、同一又は異なって、水素、フェニル又はアルキルを表し、かかるアルキルは、1)ハロゲン、アルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシで置換されていてもよいフェニル、2)2-ピリジル、3)3-ピリジル、又は、4)4-ピリジルで置換されていてもよい。)
- [2] 一般式[1]で表される化合物が、N-(ピリジン-3-イルメチル)-(2E, 4E)-5-[(1S, 2S, 4aR, 6R, 7S, 8S, 8aS)-7-ヒドロキシ-2, 6, 8-トリメチル-1, 2, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロナフタレン-1-イル]-2-メチルペンタ-2, 4-ジエン酸アミドである、請求項1記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩。
- [3] 請求項1～2記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。
- [4] 請求項1～2記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有するICAM-1発現抑制剤。
- [5] 請求項1～2記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する炎症性疾患治療剤。
- [6] 請求項1～2記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する関節リウマチ治療剤。

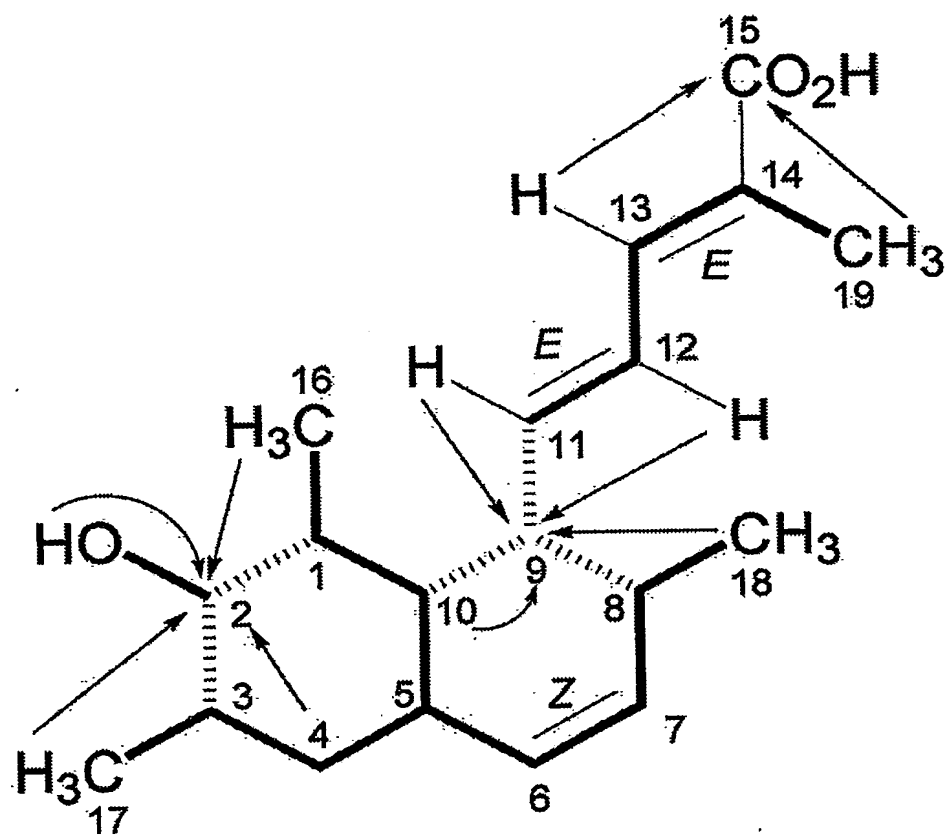
- [7] 請求項1～2記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する免疫抑制剤。
- [8] 請求項1～2記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤。
- [9] 請求項1～2記載のオクタヒドロナフタレン誘導体又はその医薬上許容される塩を有効成分として含有する抗癌剤。



[図1]

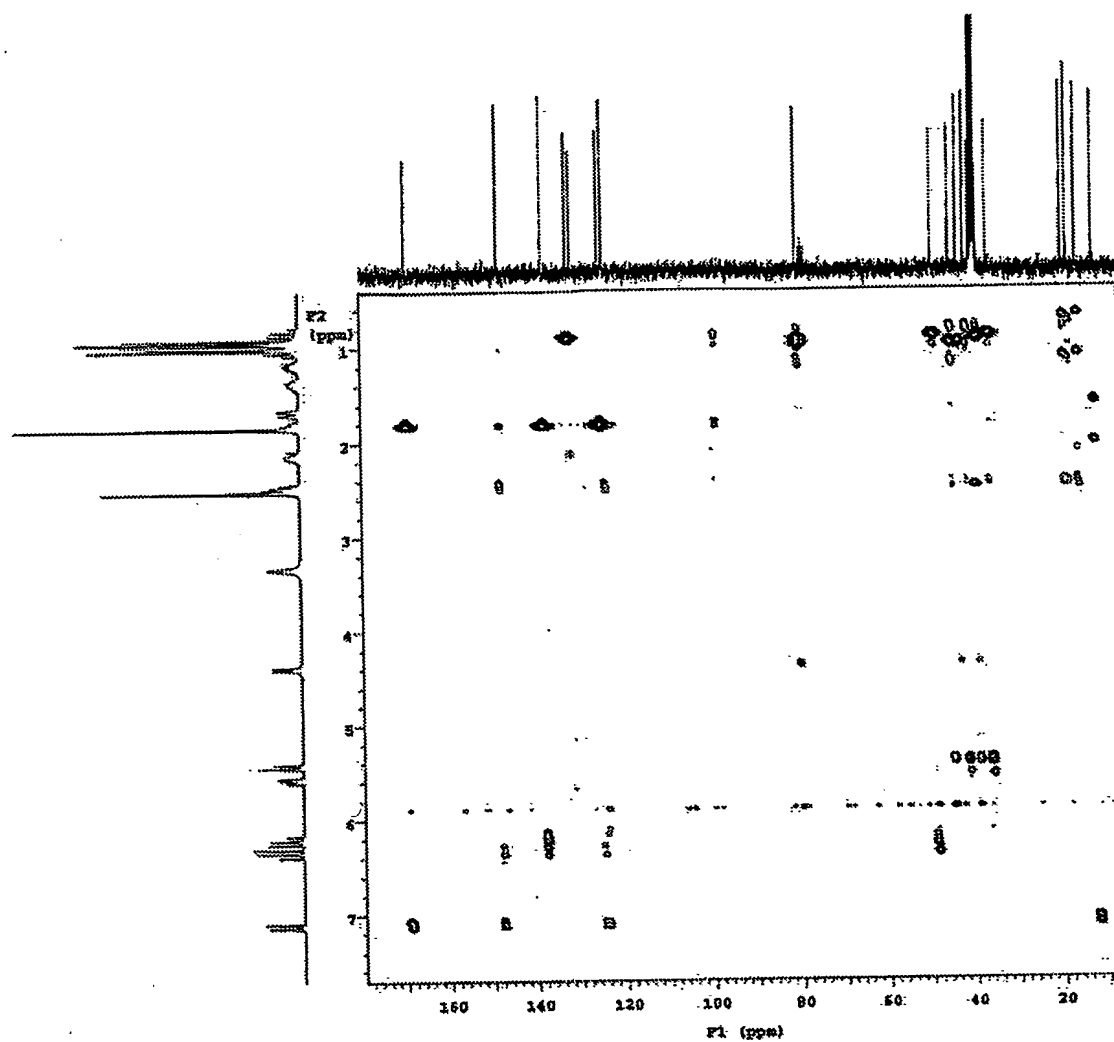


[図2]

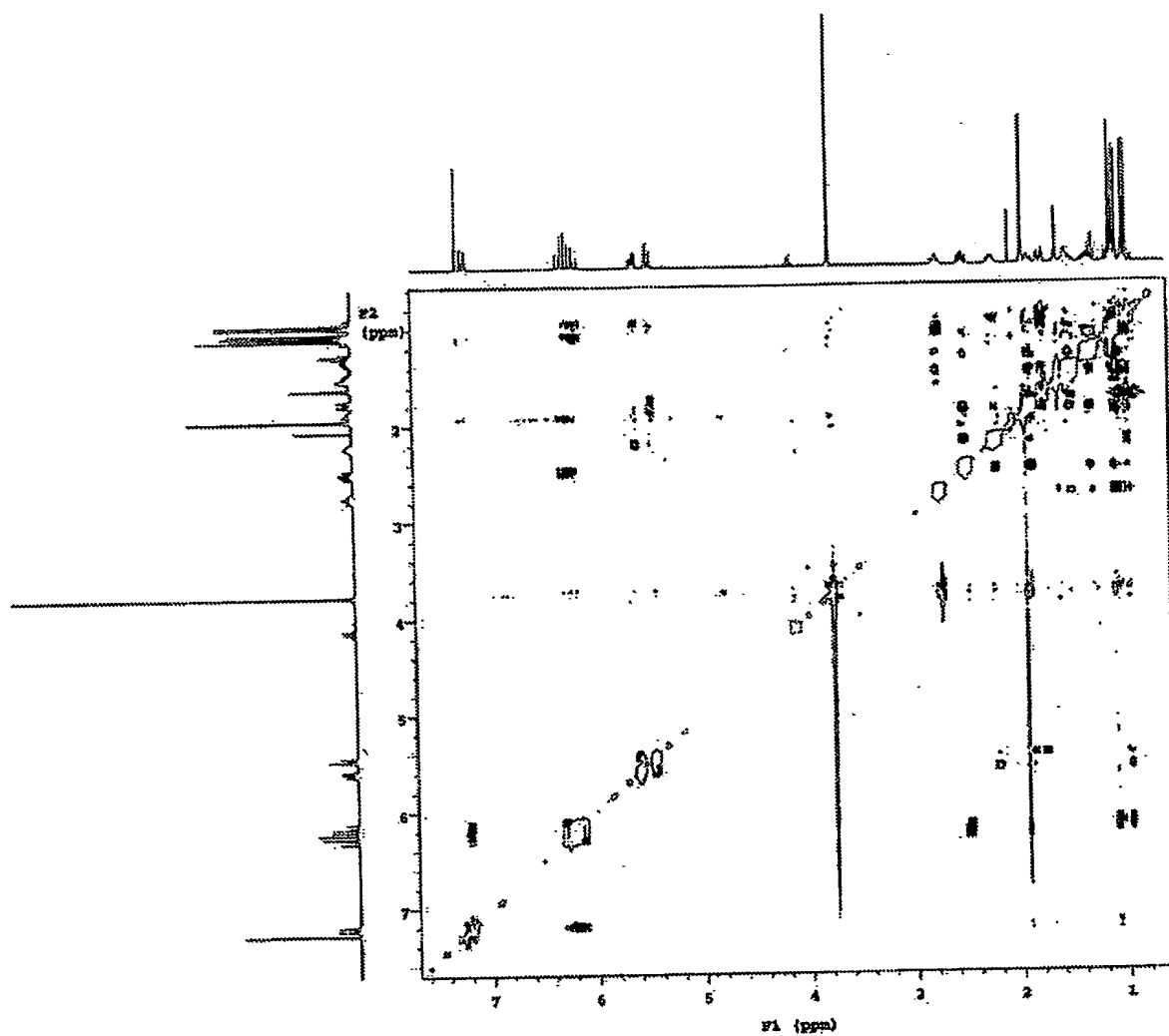


— } <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY  
-----

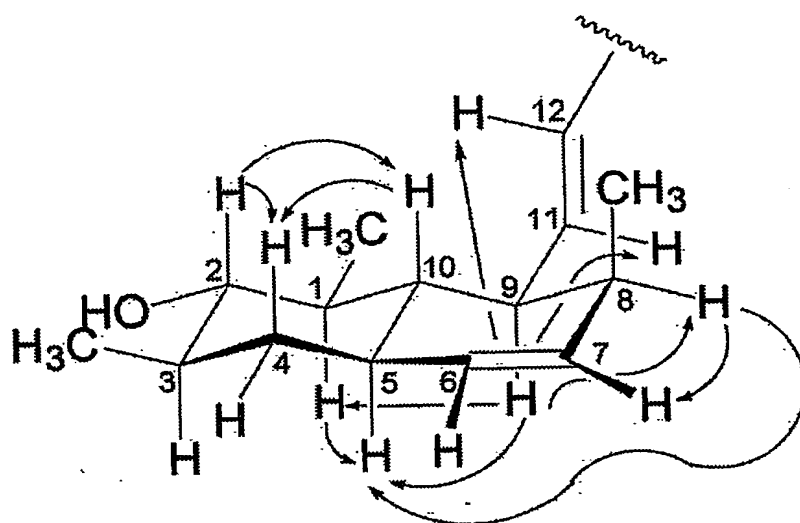
→ HMBC

[☒] 3

[X] 4]

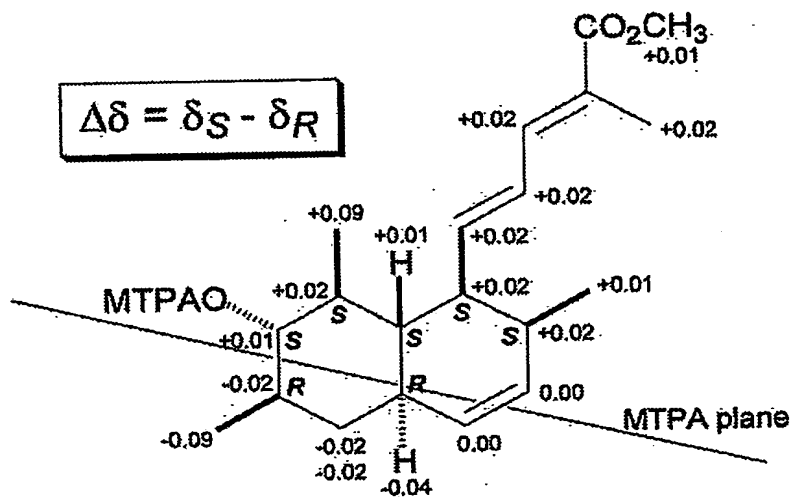


[図5]



→ NOE

[図6]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019402

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07C35/36, 43/178, 59/46, 69/732, 235/30, C07D213/40,  
A61K31/047, 31/075, 31/16, 31/19, 31/215, 31/4406, A61P29/00,  
37/06, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07C35/36, 43/178, 59/46, 69/732, 235/30, C07D213/40,  
A61K31/047, 31/075, 31/16, 31/19, 31/215, 31/4406, A61P29/00,  
37/06, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ONDEYKA, John G. et al., Coprophilin; an anticoccidial agent produced by a dung inhabiting fungus, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998, Vol.8, No.24, pages 3439 to 3442	1-9
A	JP 7-179391 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 July, 1995 (18.07.95), (Family: none)	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 February, 2005 (16.02.05)

Date of mailing of the international search report  
08 March, 2005 (08.03.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>1</sup> C07C35/36, 43/178, 59/46, 69/732, 235/30, C07D213/40,  
A61K31/047, 31/075, 31/16, 31/19, 31/215, 31/4406, A61P29/00, 37/06, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>1</sup> C07C35/36, 43/178, 59/46, 69/732, 235/30, C07D213/40,  
A61K31/047, 31/075, 31/16, 31/19, 31/215, 31/4406, A61P29/00, 37/06, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ONDEYKA, John G. et al., Coprophilin: an anticoccidial agent produced by a dung inhabiting fungus, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998, Vol. 8 No. 24, p. 3439-3442	1-9
A	JP 7-179391 A (協和醗酵工業株式会社) 1995. 07. 18 (ファミリーなし)	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 02. 2005

国際調査報告の発送日

08. 3. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
本堂裕司

4 H

9 0 4 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3443